

Jänniteherkät natriumkanavat ja mutaatioiden vaikutus niiden toimintaan.

Joonas Nurmi

LuK-tutkielma

Biologian tutkinto-ohjelma, Biotiede

Oulun yliopisto

Marraskuu 2019

Sisällys

1. Johdanto	1
1.1 Solukalvo.....	1
1.2 Aktiopotentiaali	2
2. Natriumkanavien evoluutio.....	3
2.1 Natriumkanavien esi-isät.....	3
2.2 Natriumkanavien voittokulku	4
3. Na _v -kanavien rakenne ja ominaisuudet	5
3.1 Kanavatyyppien esiintyminen.....	6
3.2 α - ja β -alayksiköiden rakenne ja vaikutus kanavan ominaisuuksiin.....	6
3.2.1 Ioniselektiivisyys.....	7
3.2.2 Jännite aktiivisuus	8
3.2.3 Natriumkanavien inaktivaatio.....	10
3.2.4 β -alayksiköt	11
4. Na _v -kanavat ja sairaudet	13
4.1 Na _v 1.1-kanavat ja epilepsia	13
4.2 Na _v 1.4- ja Na _v 1.6-kanavien yhteydet sairauksiin	14
4.3 Na _v 1.5 ja sydänsairaudet	16
4.4 Na _v -kanavat ja kipu	16
5. Loppusanat	18
6. Lähdeluettelo.....	19

1. Johdanto

1900-luvulla otettiin suuria harppauksia solukalvon rakenteen ja toiminnan ymmärryksen suhteen. Daniellelli:n ja Davson:n tutkimuksien myötä saatiin lisää todisteita solukalvon lipidirakenteesta, tämä kuitenkin poikkesi hieman nykyisestä käsityksestä (Daniell J & Davson H. 1935). Nykyisen solukalvon rakenteen kuvasivat ensimmäisenä Singer ja Nicolson 1970-luvulla, siinä kuvattiin kaksikerroksinen fosfolipidikalvo, johon oli uppoutunut transmembraaneja proteiineja (Singer SJ & Nicolson GL. 1972). Ionikanavien merkitystä, toimintaa ja rakennetta on tutkittu pitkään. Tutkimukset ovatkin osoittaneet niiden olevan tärkeässä osassa monissa elintärkeissä elimistön toiminnoissa, varsinkin hermoston viestinnässä. Reilu 50 vuotta sitten Hodgkin ja Huxley tarjosivat meille perustan näiden ionikanavien toiminnan ymmärtämiselle. Heidän käyttämällään voltage-clamp metodilla he onnistuivat mittaamaan ionien liikettä sähkövirtana. 1952 parivaljakko julkaisi viisi artikkelia, joissa kuvattiin, kuinka ionien liikehdintä solukalvon läpi loi aktiopotentiaalin. Nämä paperit pitivät sisällään Hodgkin- Huxley mallin, jolla kuvattiin matemaattisesti aktiopotentiaaleja. He eivät kuitenkaan vielä osanneet selittää mekanismia, joka aiheutti tämän natriumin sisään virtaamisen (Hodgkin A & Huxley A. 1952). Nämä tutkimustulokset ovat relevantteja vielä tänäkin päivänä. Natriumkanavien suuri merkitys kehon fysiologialle herättää luonnollisesti loogisia kysymyksiä kuten ” Mitä jos ne eivät toimi normaalisti.” ja ”Mitä tapahtuu natriumkanavan toiminnalle, kun sen rakenne muuttuu.”. Näihin oivallisiin kysymyksiin etsitään vastauksia tuoreemmissa tutkimuksissa, joissa jäljitetään syitä moniin sairauksiin kuten epilepsiaan. Nämä tutkimustulokset osaltaan auttavatkin meitä askeleen lähemmäksi näiden sairauksien syiden ja seurauksien ymmärtämistä (Catterall W ym. 2010; Sokolov S ym.2010; Lulz A ym;2015). Ennen kuin voimme kuitenkaan alkaa ymmärtämään natriumkanavia, tulee meidän ensin ymmärtää solukalvon toimintaa.

1.1 Solukalvo

Solukalvo toimii rajapintana solun ja sen ympäristön välillä, se erottaa solun sisäiset toiminnot sen ympäristöstä. Solukalvon yksi tärkeimmistä tehtävistä onkin säännöstellä aineiden kulkua sen lävitse, soluun ja solusta ulos. Osa aineista pääsee helposti solukalvon läpi ja osa tarvitsee apua päästäkseen sen yli. Tämä johtuu solukalvon rakenteesta (Keener J & Sneyd J. 2009). Rakenteeltaan solukalvo koostuu kahdesta fosfolipidikerroksesta. Fosfolipidit taas rakentuvat hydrofiilisestä fosforoidusta glyserolista ja kahdesta hydrofobisesta rasvahappo ”hännästä”. Nämä fosfolipidit ovat järjestäytyneet sillä tavalla, että hydrofiiliset osat ovat kääntyneet ulospäin kohti vettä ja hydrofobiset osat ovat

kääntyneet sisäänpäin pois päin vedestä, muodostaen kaksikerroksisen kalvon, joka läpäisee aineita valikoivasti. Fosfolipidien lisäksi kalvon lipideihin kuuluu kolesteroli ja erilaiset glykolipidit. Kolesterolimolekyylit stabiloivat kalvoa korkeammissa lämpötiloissa, tosin lämpötilan laskiessa ne myös heikentävät kalvon stabiilisuutta. Nämä kalvon lipidit aiheuttavat sen, että aineet jotka ovat hydrofiilisiä, eivät pääse kulkeutumaan passiivisella diffuusiolla kalvon lävitse. Näihin kuuluvat esimerkiksi ionit. Kalvossa on runsaasti erilaisia proteiinikomponentteja, jotka edesauttavat näiden molekyylin kuljetuksessa solukalvon läpi. Nämä proteiinit muodostavat kalvoon niin kutsuttuja ionikanavia, jotka mahdollistavat ionien kulun kalvon läpi. Ionikanavat ovat erikoistuneet kuljettamaan tiettyjä ioneja. Molekyylit, jotka ovat pienikokoisia, varauksettomia, poolittomia ja hyvän rasvaliukoisuuden omaavia, pääsevät sen sijaan helposti kalvosta läpi passiivisella diffuusiolla. Tällaisia molekyylejä ovat esimerkiksi happi, rasvaliukoiset hormonit ja hiilidioksidi (Hermann T & Sharma S. 2019).

1.2 Aktiopotentiali

Ionien konsentraatiot ovat kalvon eri puolilla erilaiset, mikä johtuu eroista solukalvon läpäisevyydessä eri ioneja kohtaan. K^+ -ionien konsentraatio on suuri solun sisällä ja pieni ulkopuolella, kun taas Na^+ -ionien konsentraatiot ovat päinvastaiset. Lepotilassa neuronin kalvo on erittäin läpäisevä kaliumioneja kohtaan, kun taas permeabiliteetti natriumioneja kohtaan on heikko. Eli lepotilassa kaliumin permeabiliteetti on paljon suurempi kuin natriumin (Hodgkin A & Katz B. 1949). Tällöin solut vuotavat jatkuvasti K^+ -ioneja ulos. Ylläpitääkseen tätä tärkeätä ionigradiienttiä solukalvolla sijaitsee Na^+/K^+ -pumppuja. Näiden pumppujen tehtävänä on kuljettaa kolme Na^+ -ionia ulos solusta ja tuoda solun sisään kaksi K^+ -ionia (Pivovarov A ym. 2019). Tämä toiminta vaatii ATP:tä ja on arvioitu, että nämä pumput käyttäisivät jopa noin 50 % kaikesta aivojen kuluttamasta energiasta (Erecinska & Silver. 1994). Pumppujen ansiosta kalvojännitteestä tulee negatiivisempi (Pivovarov A ym. 2019). Kaikki solut ylläpitävät tätä kalvojännitettä, mutta jotkin solut ovat omaksuneet kyvyn manipuloida ja hyväksikäyttää sitä. Tällaisia soluja ovat hermo- ja lihassolut (Hermann T & Sharma S. 2019). Solujen ollessa levossa niiltä mitattua kalvojännitettä kutsutaan lepojännitteeksi. Lepojännitteen arvo riippuu siitä minkä tyyppin neuronin on kyseessä, mutta yleensä se on $-40mV$:sta $-90mV$:in (Purves D. 2012). Hermoissa liikkuvat viestit kuljetetaan sähköisinä signaaleina ja nämä signaalit tuotetaan reaktiona johonkin stimulukseen. Tällöin lepojännite muuttuu. Reseptoripotentiaali syntyy, kun joku aistihermo aktivoituu ulkoisesta ärsykkeestä, kuten valosta. Neuronit käyttävät myös synapsi potentiaaleja, siirtäessään tietoa neuronista toiseen. Neuronit käyttävät erityisiä sähköisiä signaaleja välittääkseen tietoa pitkin niiden aksoneita. Näitä kutsutaan aktiopotentialeiksi. Aktiopotentiali on aktiivinen vastareaktio joka kestää noin $1ms$:n ajan.

Aktiopotentiaali vaati sen, että kalvojännite ylittää kynnyspotentiaalin, joka on kalvojännitteen arvo, jolla aktiopotentiaali tapahtuu. Aktiopotentiaalit toimivat ”kaikki tai ei mitään”-periaatteella. Tarkoittaen että, aktiopotentiaali tapahtuu täysin tai ei ollenkaan (Purves D. 2012). Miten aktiopotentiaali sitten syntyy? Hodgkin ja Huxley vuoden 1952 papereissaan todistivat, että aktiopotentiaali syntyy solukalvon permeabiliteettimuutoksista natriumioneja ja kaliumioneja kohtaan. Depolarisaatio (eli solukalvon jännitteen muutos positiivisemmaksi) aiheuttaa sen, että kalvo tulee läpäisevämmäksi Na^+ -ioneille. Tämä taas aiheuttaa nopean Na^+ -ionien kulkeutumisen solun sisään, depolarisoiden solukalvoa enemmän. Samaan aikaan K^+ -ionien permeabiliteetti kasvaa, mutta se on hitaampaa kuin natriumioneilla. Natriumionien konduktanssin nousu on erittäin lyhyt ja kääntyy laskuun. Tähän Hodgkin ja Huxley esittivät että, jokin toinen partikkeli tukkisi natriumionien kulun kalvon läpi. Tästä seuraa se, että Na^+ -ionien permeabiliteetti laskee, kun taas K^+ -ionien permeabiliteetti nousee (Hodgkin A & Huxley A. 1952). Tämä johtaa siihen, että kalvo repolarisoituu (kalvojännite palaa lepojännitteen arvoon), jota seuraa hyperpolarisaatio (kalvojännite laskee negatiivisemmaksi kuin lepojännite). Aktiopotentiaali loppuu siihen kun, tämä kohonnut K^+ -ionien permeabiliteetti laantuu ja kalvojännite palaa takaisin lepojännitteen arvoon. (Purves D. 2012)

2. Natriumkanavien evoluutio.

Natriumkanavien oletetaan kehittyneen varhaisista kalsiumkanavista, joille tapahtui duplikaatiota. Näissä duplikaateissa tapahtui muutoksia, mikä johti lopulta sellaisen ionikanavan kehitykseen, joka kykeni päästämään Na^+ -ioneja sisään (Zakon H. 2012). Noin 500 miljoonaa vuotta sitten eläimet alkoivat käyttää toisiaan ravintonaan. Saalistuksen alkamisen takia eläinten oli tärkeää pystyä liikkumaan nopeasti selvitäkseen hengissä. Tämä vaati hyvää tiedonvälitystä hermojen välillä. Natriumkanavien kyky tuottaa nopeasti depolarisaatio toimi luultavasti valinnallisena etuna ja natriumkanavat alkoivat lisääntyä aksoneiden kohdissa, joissa aktiopotentiaali aloitetaan (Kristan Jr, William B. 2016). Elämän myöhemmässä vaiheessa tapahtuneet koko genomien duplikaatiot tuottivat lisää raakaa geneettistä materiaalia, joista valinnan myötä muokkautui nykyinen natriumkanava tyyppien kirjo (Zakon HH ym. 2011 ;Widmark J ym. 2011).

2.1 Natriumkanavien esi-isät.

Ionikanavien historia ylettyy jopa noin kolmen miljardin vuoden päähän, jolloin arvellaan varhaisimpien K^+ -kanavien ilmestyneen (kaliumin vuotokanavat sekä jänniteherkät kanavat K_v). Niitä esiintyy niin bakteereilla kuin ihmisilläkin ja ne ovat ionikanavista monipuolisimpia. Jänniteherkät kaliumkanavat olivat luultavasti ainoita jänniteaktivoituvia kanavia varhaisissa eliöissä ja niiden tehtävä oli säädellä solun sisäisen liuoksen ionien määrää solukalvon venymisen mukaan (Kristan Jr, William B. 2016). Kaliumkanavat rakentuvat proteiinista, jolla on yksi domeeni, joka taas

koostuu kuudesta transmembraanista segmentistä. Todennäköisesti eukaryoottien evoluution alkutaipaleella tapahtui duplikaatio geenissä, joka koodasi tätä proteiinia. Tämän seurauksena syntyivät kanavaproteiinit, joilla oli kaksi domeenia. Tässä uudessa geenissä, joka tuotti kaksi domeenista kanavaproteiinia, todennäköisesti tapahtui uusi duplikaatio, jonka seurauksena geeni alkoi valmistaa neljä domeenista proteiinia. Tämä oli läpäisevä Ca^{2+} -ioneille ja näin syntyivät jänniteherkät kalsiumkanavat (Ca_v) (Zakon H. 2012). Natriumkanavien oletetaan kehittyneen näistä varhaisista kalsiumkanavista. Tukea tälle teorialle antaa se, että sekä Na_v - ja Ca_v -kanavat omaavat samanlaisen rakenteen eli molemmilla kanavilla on neljä domeenia ja kukin domeeni koostuu kuudesta transmembraanista segmentistä. Lisäksi kun vertaillaan Na_v -kanavien proteiinidomeenien sekvenssejä Ca_v -kanavissa vastaaviin sekvensseihin, antaa tämä vertailu suuremman samankaltaisuuden natrium- ja kalsiumkanavien välillä kuin jos vertailtaisiin vastaavia sekvenssejä natriumkanavien ja kaliumkanavien välillä (Moran Y ym. 2015). Sen lisäksi, että syntynyt kanava oli kykenevä päästämään natriumioneja solun sisään, kehittyi niihin myös inaktivaatio-mekanismi (Zakon H. 2012).

2.2 Natriumkanavien voittokulku

Natriumkanavia koodaa kaksi geeniä *Nav1* ja *Nav2*, selkärangaisilla esiintyy vain *Nav1* geeniä. Tällä hetkellä on erittäin vähän tietoa *Nav2* geenin tuottamien kanavien merkityksestä selkärangattomien fysiologialle (Zakon H. 2012). Noin 525 miljoonaa vuotta sitten fossiili aineistoon alkoi kehittyä laaja lista erilaisia ulkopuolisia suojuksia ja aseita. Tämä viittaisi siihen, että osa eläimistä alkoi saalistaa toisia eläimiä. Eläinten kasvava koko ja saalistuskäyttäminen vaativat tehokkaan viestin välityksen kehon osien välillä, mikä johti parempaan kykyyn koordinoida kehon eri osia. Varhaiset eläimet olisivat olleet kykeneviä tuottamaan aktiopotentiaaleja jo K_v - ja Ca_v -kanavilla, mutta silti valinta suosi natriumkanavia tässä tehtävässä. Yksi syy tälle voisi olla, että tällöin eläin pystyisi käyttämään näitä kalsiumkanavia hyödyksi muuten, kuten viestimolekyylien vapauttamiseen tai eläin pystyisi vähentämään solun sisäisen Ca^{2+} -ionien konsentraation kasvua myrkylliselle tasolle. Toinen vaihtoehto voi olla natriumkanavien kyky tuottaa nopeammin depolarisaatio ja tehokkaampi viestin johtuminen kuin kalsiumkanavilla. Saalistuksen kehittyessä nopeampiin liikkeisiin kykeneminen oli erittäin hyödyllistä ja Na_v -kanavat valikoituivat hoitamaan tätä nopeaa viestintää kehon osien välillä (Kristan Jr, & William B. 2016). Natriumkanavat sopivat loistavasti tähän tarkoitukseen. Varhaisissa selkäjänteisissä ne alkoivat pakkaantua niihin kohtiin aksoneita, joissa aktiopotentiaalit saivat alkunsa. Hypätään ajassa 50 miljoonaa vuotta eteenpäin jolloin, aksoneihin kehittyi eristävä myeliini. Tämä nosti signaalien nopeutta. Na_v -kanavat hyödynsivät tätä uutta evoluution innovaatiota ja

alkoivat pakkautua aksoneissa kohtiin, joita kutsutaan Ranvierin kuroumiksi (kohta aksonissa, jossa ei ole myeliiniä). Siellä ne tuottivat tarpeeksi suuren depolarisaation aksonissa, joka riittäisi aktivoimaan natriumkanavat seuraavassa kuroumassa (Zakon H. 2012).

Nykyisillä nisäkkäillä esiintyy yhdeksän geeniä, jotka koodaavat Nav-kanavia ja yksi geeni joka koodaa ei jänniteherkkää natriumkanavaa (Na_x). Nämä ovat peruja koko genomien duplikaatioista. Kaksi genomien duplikaatiota tapahtui ennen kuin tetrapodien ja varsinaisten luukalojen linjat erosivat toisistaan. Tämä näkyy siinä, että niiden yhteisellä esi-isällä *Elasmobranchii*:ssa on neljä Nav1-geeniä (Zakon H. 2012). Varsinaisten luukalojen linjalle tapahtui vielä yksi koko genomien duplikaatio, mistä johtuen niillä esiintyy kahdeksan Nav1-geeniä. Tetrapodien linjassa tapahtui sarja tandem-duplikaatioita Nav1-geeneille, minkä takia syntyi yhdeksän Nav1-geeniä. Nisäkkäiden linjan alkuvaiheessa tapahtui vielä yksi geeni duplikaatio, josta syntyi kymmenes geeni Na_x (Novak, A.E. 2006). Nav1-geenien viereiset geenit, jotka olisivat duplikaatioissa duplikoituneet niiden kanssa ovat säilyneet paljon heikommin tetrapodeilla verrattuna Nav1-geeneihin. Samanlaisia tuloksia on saatu varsinaisten luukalojen linjasta. Näiden lisäksi tutkimustuloksista selvisi, ettei muissa ionikanavia koodaavissa geeneissä ole tapahtunut laajalti duplikaatioita tai niiden säilymistä tetrapodeissa sen jälkeen, kun tetrapodien ja varsinaisten luukalojen linjat erosivat (Zakon H ym. 2011; Widmark J ym. 2011). Näiden tietojen pohjalta on päätelty, että valinta olisi vaikuttanut Nav1-duplikaattien säilyvyyteen. Tähän voisi olla syynä, että uudenlaiset kanavatyyppit paransivat hermoston laskennallisia ominaisuuksia sekä energiatehokkuutta (Zakon H. 2012).

3. Nav-kanavien rakenne ja ominaisuudet

Kykymme urheilla tai nähdä ympärillä oleva maailma riippuu neuroneiden kyvystä nopeaan viestintään. Tämä viestintä tapahtuu sähköisten signaalien välittämällä neuronilta toiselle. Nämä signaalit tuotetaan hermostossamme jänniteherkillä ionikanavilla (Armstrong C & Hillie B. 1998). Jänniteherkät natriumkanavat ovat isossa roolissa aktiopotentiaalien synnyssä. Kalvon depolarisoituessaan muutamaksi millisekunniksi, natriumkanavat aktivoituvat ja inaktivoituvat muutaman millisekunnin sisällä. Tämä johtaa siihen, että solukalvo entisestään depolarisoituu, mikä taas aloittaa aktiopotentiaalin (Purves D. 2012). Kaikki nämä edellä mainitut ominaisuudet ovat riippuvaisia natriumkanavan rakenteesta, joka koostuu α - ja β -alayksiköistä. Vaikka meillä on ollut jo pitkään käytössä täydellinen aminohapposekvenssi näille ionikanaville, meillä ei kuitenkaan ole vielä hyvää 3D-kuvaa niiden rakenteesta (Armstrong C & Hillie B. 1998). Paljon tietoa on saatu tutkimuksista, joissa on korvattu tärkeiksi arveltuja aminohappoja muilla aminohapoilla ja mitattu näiden aiheuttamat muutokset kanavan ominaisuuksiin (Heinemann SH ym. 1992; Stuhmer ym. 1989; Yang N ym. 1996).

3.1 Kanavatyyppien esiintyminen

Ihmislä on tunnistettu yhdeksän erilaista α -alayksikköä ($\text{Na}_v1.1$ - $\text{Na}_v1.9$). Nämä alayksiköt muodostavat natriumkanavien huokoisen rakenteen, jonka kautta Na^+ -ionit pystyvät kulkemaan (Ahern CA ym.2015). α -alayksiköiden lisäksi natriumkanavien rakenteisiin kuuluvat β -alayksiköt, jotka vaikuttavat kanavien toiminnallisiin ominaisuuksiin. Viisi erilaista β -alayksikköä on onnistuttu tunnistamaan $\beta1$, $\beta2$, $\beta3$, $\beta4$ ja $\beta1b$, näistä $\beta1b$ on vaihtoehtoisen silmukoinnin tulos (Zhu W ym.2017). Jokainen α -alayksiköistä eroaa toiminnallisesti hieman toisistaan. Tästä johtuen erilaiset kanavatyyppit esiintyvät erilaisissa kudoksissa tai eri vaiheissa yksilön kehitystä. Kaikille kanaville löytyy oma tehtävänsä nisäkkäiden fysiologiasta. Jyrsijöillä $\text{Na}_v1.3$ tyyppiä esiintyy sikiön hermokudoksessa, kun taas aikuisessa yksilössä $\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.2$ ja $\text{Na}_v1.6$ kanavia esiintyy runsaasti keskushermostossa. $\text{Na}_v1.1$ ja $\text{Na}_v1.3$ esiintyvät suurimmalta osalta neuroneiden soomissa, joissa ne säätelevät neuroneiden herkkyyttä aloittaa tai jatkaa aktiopotentiaalia. $\text{Na}_v1.2$ esiintyy aksoneissa, joissa ei ole myeliinieristettä. Yksilön kehittyessä on huomattu, että $\text{Na}_v1.6$ tyyppin kanavat korvaavat $\text{Na}_v1.2$ kanavat Ranvierin kuroumissa aikuisessa yksilössä. $\text{Na}_v1.1$ ja $\text{Na}_v1.6$ esiintyvät myös ääreishermostossa, mutta kanavatyyppit, joita siellä esiintyy eniten, ovat $\text{Na}_v1.7$ - $\text{Na}_v1.9$ kanavat. Näistä kolmesta kanavatyyppistä $\text{Na}_v1.7$ esiintyy eniten ääreishermostossa, kun taas $\text{Na}_v1.8$ ja $\text{Na}_v1.9$ esiintyvät vain tuntoaistihermoissa spinaali- ja trigeminaaliganliossa. Siellä niillä on keskeinen tehtävä kipuaistimuksen luomisessa. Sydämen ja luuston lihaksien toimintaan vaikuttavat $\text{Na}_v1.4$ ja $\text{Na}_v1.5$ kanavat (Catterall W & Yu F. 2003). β -alayksiköt ovat myös laajalti levinneet, niitä löytyy molemmista keskus- sekä ääreishermostosta. Lisäksi niitä löytyy sydän- ja luustonlihaksista. Kuten α -alayksiköillä, β -alayksiköiden esiintymisessä elinten välillä on eroja, esimerkiksi $\beta1$:stä on paljon luustonlihaksissa, mutta $\beta3$:sta ei. Eroja β -alayksiköiden jakaumassa on jopa havaittavissa samassa elimessä. Tämä voisi viitata siihen, että ne voisivat muokata Na_v -kanavia juuri sopiviksi solujen tarpeiden mukaan (Zhu W ym.2017).

3.2 α - ja β -alayksiköiden rakenne ja vaikutus kanavan ominaisuuksiin

Ihmislä on löydetty yhdeksän erilaista α -alayksikköä, jotka muodostavat reitin ioneille solukalvon läpi. Näiden alayksiköiden aminohappojärjestyksien homoloogisuudesta on päätelty, että niiden proteiinien domeenit ja transmembraanit rakenteet ovat samankaltaisia (Ahern CA ym.2015). α -alayksiköt koostuvat neljästä homologisesta domeenista (DI-IV), jotka ovat liittyneitä toisiinsa suhteellisen isoilla solun sisäisillä luopeilla. Niiden lisäksi suuret N- ja C-terminaalialueet sijaitsevat

solun sisäpuolella. Jokainen domeeni koostuu taas kuudesta transmembraanisesta segmentistä (S1-S6), jotka ovat rakenteeltaan α -heliksisiä. Pienet solun ulkopuoliset luupit yhdistävät nämä segmentit toisiinsa (Catterall W 2000).

3.2.1 Ioniselektiivisyys

Jotta aktiopotentiaalille ominainen terävä depolarisaatio pystyisi tapahtumaan, tulee natriumkanavien päästää Na^+ -ioneita sisään ja estää K^+ -ioneita pääsemästä ulos sekä ehkäistä Ca^{2+} -ioneita tukkimasta kanavaa niin, etteivät Na^+ -ionit pääse kulkemaan kanavan läpi (Armstrong C & Hillie B 1998). Mistä sitten johtuu kanavan ionispesifisyys natriumionia kohtaan? Kokeelliset tutkimukset viittaisivat kanavan muodostaman huokosen ulommalla eteisellä olevan tärkeä rooli tässä. Täällä sijaitsevat aminohapot toimivat reseptorialueena natriumionikanavia tukkiville hermomyrkyille, tetrodotoxinille ja saxitoxinille. Voltage-clamp menetelmää käyttämällä pystyttiin mallintamaan kuinka tetrodotoxin ja saxitoxin toimivat tulppana ionifiltterissä (Catterall W. 2000). Mutaatioanalyysit paljastivat, että glutamaatti domeenilta I on tärkeässä roolissa näiden hermomyrkyjen kiinnittymisessä kanavaan (Noda ym. 1989). Tätä seuraavissa tutkimuksissa huomattiin myös muita tärkeitä negatiivisesti varautuneita aminohappoja, jotka voisivat toimia reseptorialueena hermomyrkyille sekä toimia myös ionispesifisenä filtterinä (Catterall W. 2000). Tutkimuksissa huomattiin myös, että pH:n alentaminen natriumkanavan ulkopuoleisessa liuoksessa vähentää natriumionien läpäisevyyttä. Se viittaisi siihen, että pH:n lasku neutraloisi tärkeitä happoryhmiä, jotka sijaitsisivat uloimmissa osissa kanavaa. Ne ovat osaltaan vastuussa Na^+ -ionien selektiivisyydestä (Woodhull AM. 1973). Tämä uloimmainen eteinen koostuu domeenien I-IV segmenteistä viisi sekä kuusi ja niiden välillä olevasta P-luopeista. Nämä neljä P-luuppia pitävät sisällään useita varauksellisia aminohappoja. Näiden aminohappojen asettuessa renkaan tapaiseen asemaan, syntyy kaksi rengasta ulompi ja sisempi rengas kanavan sisälle (Fozzard HA & Lipkind GM. 2010). Kultakin domeenilta (I-IV) kaksi aminohappoa osallistuu näiden renkaiden muodostukseen (Catterall W & Yu F. 2003). Sisempi rengas koostuu neljästä aminohaposta: aspartiittihaposta, glutamiinihaposta, lysiinistä ja alaniinistä, näistä käytetään lyhennettä DEKA-rengas. Tämä nimi tulee aminohappojen yksikirjaimisesta koodista. Ulompi rengas koostuu myös neljästä aminohaposta. Kaksi ensimmäistä aminohappoa ovat glutamiinihappoja, kolmas voi olla joko aspartaattihappo tai metioniini ja viimeisenä aminohappona on aspartaattihappo (Fozzard HA & Lipkind GM. 2010). Mutaatioanalyysiä käyttämällä on onnistuttu osoittamaan DEKA-renkaan merkitys natriumkanavien ioniselektiivisyydelle (Ahern CA ym. 2015). Todella vahvaa näyttöä tukemaan tätä ajatusta tarjosi 1992 tehty tutkimus, jossa aiheutettiin mutaatioita sisempään renkaaseen eli DEKA:n

aminohappoihin. Kokeessa lysiini ja alaniini korvattiin glutamaattihapolla. Tuloksena oli natriumionikanava, joka oli kalsiumionispesifinen. Tulokset entisestään vahvistivat käsitystä siitä, että nämä aminohapot ovat vastuussa ionikanavien selektiivisyydestä (Heinemann SH ym. 1992). Kanavan kapein kohta olisi kokonsa puolesta kykenevä päästämään kaliumioneja lävitse, mutta tätä kuitenkin tapahtuu paljon vähemmän suhteessa natriumioneihin. Tähän Bertill Hille ehdotti syyksi, että kanavaan saapuneet ionit ovat osittain päässeet eroon niitä ympäröivistä vesimolekyyleistä. Tällöin pienemmät ionit, kuten natriumionit, stabiloituvat paremmin kuin kookkaammat kaliumionit renkaissa olevien negatiivisia varauksia omaavien aminohappojen avulla (Armstrong C & Hillie B. 1998). DEKA-renkaassa varsinkin lysiini ja glutamiinihappo vaikuttaisivat olevan todella tärkeitä ylläpitämään korkeata natriumionien läpäisevyyttä suhteessa kaliumioneihin. Fozzard ja Lipkind tekivät simulaatioita ja päättelivät, että taustalla oleva mekanismi voisi johtua natriumionin vuorovaikutuksesta domainin II glutamiinin kanssa, tällöin glutamiinin karboksyyliiryhmän vuorovaikutus domeenilla III sijaitsevan lysiinin kanssa häiriytyisi, mikä taas mahdollisesti liikuttaisi lysiiniä (DIII) kohti domeenin IV alaiinia. Jotta natriumioni pystyisi vuorovaikuttamaan tällä tavoin glutamiinihapon(DII) kanssa, sen tarvitsisi päästä eroon vain 1-2 vesimolekyylistä sen ympäriltä (Ahern CA ym. 2015).

3.2.2 Jänniteaktiivisuus

Hodgkin ja Huxley huomasivat tutkimuksissaan, että Na^+ -ionien sisäänvirtaus, joka synnyttää sähkövirran (I_{Na}) on yhtä suuri kuin natriumionien konduktanssi (g_{Na}) kertaa kalvojännitteen (E_v) ja natriumionien tasapainopotentiaalin (E_{Na}) erotus. Heidän kokeensa viittasivat siihen, että g_{Na} olisi riippuvainen ajasta ja solukalvon jännitteestä. Tämä g_{Na} riippuvuus kalvonjännitteestä viittaisi siihen, että muutokset Na^+ -ionien permeabiliteetissa johtuisivat muutoksista varauksellisten molekyylien orientaatiossa solukalvon sisällä. Se taas johtuisi sähkökentän vaikutuksesta näihin molekyyliin. Tästä liikkeestä pitäisi syntyä mitattava sähkövirta, jota he eivät kuitenkaan onnistuneet mittaamaan. (Hodgkin AL & Huxley AF. 1952). Armstrong ja Bezanilla onnistuivat mittaamaan näitä Hodgkin:n ja Huxley:n ennustamia ”gating-current”:ja. Heidän mittauksissaan näkyi, että ennen natriumkanavien avautumisesta johtuvaa depolarisaatiota syntyi ohimenevä ulospäin suuntautuva sähkövirta ja kun kanavat sulkeutuvat, syntyi sisäänpäin suuntautunut sähkövirta. Tämä väheni suurin piirtein samaan tahtiin kuin I_{Na} (Armstrong & Bezanilla. 1974). On arvioitu, että 12 varauksellisen partikkelin tulisi liikkua kalvon sähkökentässä synnyttääkseen tällaisen sähkövirran (Hirschberg B. 1995). Tällaisia molekyyliä on löydetty kaikilta jänniteherkän natriumionikanavan homologisilta proteiinidomeeneilta (DI-IV). Jokaisessa homoloogisen domeenin(I-IV) S4 transmembraanisessa segmentissä on toistuvasti positiivisesti varautuneita aminohappoja. Näitä

seuraa kaksi hydrofobista aminohappoa ja niiden ajatellaan muodostavan sylinterin muotoisen α -helikaalisen rakenteen, jota ympäröivät positiivisen varauksen omaavat aminohapot. ”The sliding-helix” (Catterall 1986) ja ”helical screw” (Guy & Seetharamulu 1986) mallit ehdottavat, että nämä positiivisen varauksen omaavat segmentit stabiloituvat transmembraanisessa ympäristössä niiden viereisten segmenttien omaavien negatiivisten varauksien ansiosta. Sisäpuolella oleva negatiivinen varaus vetäisi niitä soluun päin lukittuun asemaan. Depolarisaation tapahtuessa nämä segmentit vapautuisivat tästä, joka mahdollistaisi niiden liikkumisen ulospäin pyörimällä. Liikuttuaan ulospäin nämä positiiviset varaukset pysyisivät neutraloituina johtuen viereisistä negatiivista varauksista viereisissä segmenteissä (lähinnä S2-S3). Tämän liikkumisen seurauksesta tapahtuisi konformaatiomuutoksia kanavassa, jotka avaisivat sen Na^+ - ionien läpikululle (Catterall 2000). Tutkimuksissa on huomattu, että kun näihin jännitesensorisegmentteihin korvataan mutaatiolla jokin positiivisen varauksen omaavaa aminohappo, se vaikuttaa kanavan jänniteaktiivisuuteen (Stuhmer ym. 1989). Todisteita ulospäin suuntautuvasta liikkeestä tarjosivat tutkimukset, jossa korvattiin domeenin IV S4 aminohappoja kysteiniillä. Sekä solun sisäpuoliseen liuokseen, että ulkopuoliseen liuokseen lisättiin tiolireagenssia. Tiolireagenssin ja kysteinin välinen reaktio muutti kanavan inaktivaation ominaisuuksia ja näitä pystyttiin mittaamaan. Hyperpolarisaation aikana kysteiniä ei ollut saatavilla reaktioon. Tällöin kanavan ominaisuudet eivät muuttuneet ja tämä tuki ajatusta siitä, että depolarisaatio tarvittaisiin näiden segmenttien liikkeen syntymiseen. Depolarisaation aikana kysteinin saatavuus solun ulkopuolisille reagensseille kasvoi, kun taas sisäpuolisille reagensseille väheni. Tämä viittaisi siihen, että segmentti liikkuisi ulospäin. Tutkimuksen tuloksista oli pääteltävissä, että DIV:n S4:stä kolme varauksellista aminohappoa tuli saataville reaktioille, jos loput kolme S4 segmenttiä pystyvät liikkumaan tällä tavoin, niiden pitäisi pystyä tuottamaan riittävä ”gating current”, joka on liitetty kanavan avautumismekanismiin. Tämä on paljon enemmän liikettä kuin kumpikaan edellä mainittu mallit ennustivat. Tähän selitykseksi Yang ym. tarjosivat, että nämä segmentit liikkuisivat niille erikoistuneille kanaviin (Yang N & Horn R. 1995) (Yang N ym. 1996). Chanda ja Bezanilla huomasivat kokeissaan, että domeenin IV segmentti neljä on huomattavasti hitaammin aktivoituva kuin domeenien I-III S4-segmentit. Lisäksi tämän segmentin aktivaatio korreloi inaktivaation aloitusta (Chanda B & Bezanilla F. 2002). He huomasivat kokeissaan, että natriumkanavan aktivaatio koostuu vähintään kahdesta vaiheesta, alustavasta avautumisesta mikä johtuu DI-III jännitesensoreiden aktivoitumisesta ja tätä seuraavasta heikommin johtavasta vaiheesta, joka johtuu DIV jännitesensorin aktivoitumisesta. Tämä kanavan heikommin johtava vaihe edeltää sekä tahdittaa kanavan inaktivaatiota. DIV:n jännitesensori ei itsessään ole inaktivaatiopartikkeli, vaan sen liikkeen aiheuttamat konformaatiomuutokset kanavaan mahdollistavat nopean inaktivaation tapahtumisen (Goldschen-Ohm MP ym. 2013).

3.2.3 Natriumkanavien inaktivaatio

Inaktivaation tarkoituksena on sulkea natriumkanavat ja estää niitä aukeamasta ennen kuin solut ovat ehtineet toipua edellisestä depolarisaation aiheuttamasta aukeamisesta. Mikäli kanavien ollessa inaktivoituneena tapahtuu uusi depolarisaatio, kanavat pysyvät kiinni. Inaktivaatio myös heikentää solun kynnystä lähettää aktiopotentiaaleja pitkän depolarisaation aikana, täten estäen ionigradientin hajoamisen ja solukuoleman (Golding AL. 2003). Kun solukalvo on hyperpolarisoituna ennen depolarisaatiota, sekä aktivaatio että inaktivaatio hidastuvat. Tämä viittaa siihen, että kanavan täytyy aktivoitua ennen kuin se voi inaktivoitua. Kanavan siis tulee olla auki ennen kuin inaktivaatio voi tapahtua (Benazilla F & Armstrong CM. 1977). Domeenin IV jännitesensorin aktivaatio on linkitetty inaktivaation aloitukseen. Tämän segmentin liike transmembraanissa ympäristössä luo kanavaan konformaatiomuutoksia, jolloin inaktivaatiopartikkelille vapautuu kiinnittymispaikka (Goldschen-Ohm. ym. 2013). Inaktivaatityyppisiä on ainakin kaksi: nopea inaktivaatio ja hidas inaktivaatio. Kummankin tyyppisiä inaktivaatioita esiintyy kaikissa jänniteherkissä natriumkanavissa. Nopea inaktivaatio tapahtuu yhden aktiopotentiaalin aikana, kun taas hidas inaktivaatio tapahtuu pitkäkestoisen depolarisaation aikana (60-90s). Nämä tyypit ovat riippuvaisia kanavan rakenteesta ja erilaiset lääkeaineet vaikuttavat niiden toimintaan (Vilin Y & Ruben P. 2001)

Nopean inaktivaation ajatellaan tapahtuvan ”ball in the chain” tai ”hinged lid” mekanismilla, jolloin inaktivaatiopartikkeli kiinnittyy läheiselle kiinnitysalueelle tukkien samalla kanavan (Goldin AL. 2003). Tärkeätä rooli inaktivaatiossa on domeenien III-IV välillä oleva solun sisäinen luuppi. Luupista on onnistuttu tunnistamaan kolme tärkeätä hydrofobista aminohappoa, joita kutsutaan IFM-pätkäksi (Isoleusiini, phenyyialaniini ja metioniini). Mutaatiot näissä kolmessa aminohapossa estävät nopean inaktivaation. IFM-pätkää reunustaa toiselta puolen glysiini ja toiselta puolelta proliini. Ne ovat erittäin konservoituneita rottien kanavissa ja saattavat toimia ”Hinged lid” mekanismin saranoina, jotka mahdollistavat luopin liikkeen sisään ja ulos kanavasta (Catterall W. 2000). Lisää vahvaa näyttöä IFM-pätkän roolista inaktivaatiossa tarjosi tutkimus, jossa IFM-pätkän sisältäviä pieniä peptidejä lisättiin soluun, jolta oli mutaatioiden avulla poistettu inaktivaatio kyky. Lisätyt IFM-pätkät palauttivat kanavien kyvyn nopeaan inaktivaatioon. Tästä pääteltiin, että IFM-pätkä kiinnittyisi inaktivaation aikana solun sisäpuolella olevalle kanavan suulle, tukkien sen (Eaholtz G. 1994). DIII-IV välisen luopin lisäksi on onnistuttu tunnistamaan muita osia, jotka ovat tärkeitä nopealle inaktivaatiolle. Muutokset arvellulla IFM:n reseptorialueella, eli kanavan suuta vuoraavassa segmentissä (DIV:n segmentin kuusi solun sisäpuoleisessa päässä), tekevät inaktivaatiosta vähemmän stabiilin ja nopeuttavat palautumista siitä. Sytosolin puoleisen kanavan suun lähellä oleva

segmenttien neljä ja viisi välissä oleva luuppi sisältää myös tärkeitä aminohappoja, jotka luultavasti muodostavat osan reseptorialueesta IFM-pätkälle. Tästä luupista on onnistuttu tunnistamaan kolme merkittävää aminohappoa phenyyialaniini¹⁶⁵¹, leusiini¹⁶⁶⁰ ja asparagiini¹⁶⁶². Mutaatiot näissä aminohapoissa heikentävät inaktivaation stabiilisuutta (McPhee J ym. 1998). Nopeaa inaktivaatiota näiden lisäksi voidaan muokata kanavan C-terminaalilla ja kanavan β -alayksikoilla. Ne muokkaavat inaktivaation nopeutta, kestoa ja siitä palautumista kanavatyypin tarpeiden mukaan (Goldin AL. 2003).

Erilaiset inaktivaatio tilat ovat riippuvaisia depolarisaation pituudesta. Se viittaa siihen, että on mahdollisesti olemassa useita erilaisia hitaita inaktivaatio tiloja, joita ei edes ole onnistuttu tunnistamaan vielä. Löydöt todella hitaasta ja kohtuullisen hitaasta inaktivaatiosta vahvistavat tätä ajatusta. Hidas inaktivaatio on kunnolla hahmotettu vain Nav1.4 ja Nav1.5 kanavissa. Näistä Nav1.4 omaa paljon isomman todennäköisyyden hitaan inaktivaation tapahtumiselle (80 %) kuin Nav1.5 (40%) (Vilin Y& Ruben P). Hitaaseen inaktivaation näissä kanavissa liittyy useita alueita kuten DIV:n segmentti neljä, DII:n segmentit viisi ja kuusi. Esimerkiksi yhden aminohapon muutos DII S6:ssa pystyy muuttamaan hitaan inaktivaation kinetiikkaa. Luultavasti hidas inaktivaatio edellyttää isohkoja konformaatio muutoksia kanavan rakenteessa, mutta toistaiseksi ei ole tietoa mekanismista mikä estää Na⁺-ionien läpikulun (Golding AL. 2003)

3.2.4 β -alayksiköt

β -alayksikoita koodaavat ihmisellä geenit *Scn1b-Scn4b*, jotka tuottavat β 1- β 4- alayksikoita. Niiden lisäksi vaihtoehtoisella silmukoinnilla *Scn1b* geenistä voidaan koodata β 1b-alayksikköä. β -alayksikkö tyypit α -alayksiköiden tavoin esiintyvät tietyissä kudostyypeissä (Namadurai S ym. 2015). Esimerkiksi β 1-alayksiköt ovat erittäin yleisiä luustonlihaksistossa, kun taas β 3-tyyppiä esiintyy vähemmän siellä. β -alayksikköjen jakaumassa on eroja jopa saman elimen osien välillä. Tämä viittaisi siihen, että β -alayksiköt muokkaavat Nav-kanavia sopimaan juuri tietyn solutyypin vaatimuksien mukaan (Zhu W ym. 2017).

β -alayksiköt kuuluvat immunoglobuliini (Ig) domeeniperheeseen. Ne jakavat samankaltaisen rakenteen lukuun ottamatta β 1b-tyyppiä. Niiden rakenne koostuu solun ulkopuolisesta N-terminaalista, immunoglobuliinin muodostamasta luupista ja yhdestä transmembraanista domeenista, joka kiinnittyy sytosolissa olevaan pieneen C-terminaaliin. Intronien vaihtoehtoisen silmukoinnin takia β 1b-tyypin alayksiköllä on erilainen C-terminaali. Siltä puuttuu kokonaan transmembraani domeeni, sen sijaan se sisältää stop-kodonin ja polyadenylaatio-alueen. Tämän ansiosta β 1b on

liukeneva proteiini. β -alaysiköistä $\beta 1$ ja $\beta 3$ vaikuttavat α -alaysiköihin ei-kovalenttisesti, kun taas $\beta 2$ ja $\beta 4$ tyypit ovat liittyneenä α -alaysikköön disulfidi-sidoksella (Brackenbury W & Isom L 2011). Tutkimuksissa on onnistuttu tunnistamaan tärkeät aminohapot $\beta 2$ -alaysiköstä ja $\text{Na}_v 1.2$ kanavasta, joiden välille syntyy disulfidi-sidos. Siinä onnistuttiin tunnistamaan, että sidos syntyy $\beta 2$ -alaysikön $^{55}\text{Cys:n}$ ja $\text{Na}_v 1.2$ kanavan domeenin II luupissa sijaitsevan ^{910}Cys välille (Das S ym. 2016).

Vaikka β -alaysiköillä on samankaltaiset rakenteet (lukuun ottamatta $\beta 1b$ -tyyppiä), niillä on hiukan erilaiset ominaisuudet ja oikeanlaisella yhdistelmällä β -alaysiköitä ja α -alaysiköitä pystytään räätälöimään juuri oikeat ominaisuudet omaavat kanavan solun vaatimuksiin. Nämä ominaisuuden muutokset ovat solutyypispesifisiä eli samalla β -alaysiköllä voi olla erilainen vaikutus erissä solutyypeissä. $\beta 1$ -ja $\beta 3$ -alaysiköt aiheuttavat useasti kanavan aktivaation ja inaktivaation jänniteriippuvuuden siirtymisen negatiivisimmille jännitteen arvoille. Tämä johtaa suurempaan aktiopotentiaalin laukaisu todennäköisyyteen. Esiintyessään yhdessä $\text{Na}_v 1.2, 1.3$ ja 1.5 $\beta 1$ -ja $\beta 3$ -alaysiköt aiheuttavat suurimman osan näistä jänniteherkkyyden muutoksista (Namadurai S ym. 2015). Wandu Zhu kumppaneineen osoitti, että $\beta 1$ -alaysikkö säätelee sydämessä olevien $\text{Na}_v 1.5$ toimintaa domeenin IV jännitesensorin avulla. Kun taas $\beta 3$ -alaysikkö vaikuttaa siihen domeenin III jännitesensorin kautta. Tästä seurasi, että kanavien aktivaatio tarvitsi korkeamman depolarisaation, lisäksi $\beta 1$ -alaysikkö nopeutti kanavien toipumista inaktivaatiosta (Zhu W ym. 2017). Toisaalta $\beta 3$ -alaysiköllä ei näyttäisi olevan juuri vaikutusta $\text{Na}_v 1.6$ -ja $\text{Na}_v 1.8$ -kanavien jänniteaktiivisuuteen (Namadurai S ym. 2015). $\beta 2$ -alaysiköitä esiintyy laajalti keskushermostossa. Esiintyessään $\text{Na}_v 1.2$ kanavien kanssa ne muovaavat kanavan aktivaatiota ja inaktivaatiota nopeammaksi, kun taas tuntohermoissa esiintyvissä natriumkanavissa sillä ei näyttäisi olevan juuri ollenkaan vaikutusta niiden ominaisuuksiin (Chahine M & O'Leary 2011). $\beta 2$ -alaysiköt liittyvät myös α -alaysiköiden biosynteesin viimeiseen osaan päästämällä ne solukalvoon. Eli niillä on tärkeä rooli Na_v -kanavien määrän ylläpitämisessä ja niin tehdessään ne samalla ylläpitävät aktiopotentiaalien kynnykset sopivina. Kokeessaan Chen ym. poistivat hiiriltä geenin, joka koodasi $\beta 2$ -alaysikköä. Se vähensi Na_v -kanavien määrää noin 50 %:lla hippokampuksen neuroneissa. Tämän seurauksena luultavasti inhibitoivien hermojen aktiivisuus väheni nostaen kokonaisaktiivisuutta. Mikä taas johti pienempään kynnykseen saada epileptinen kohtaus (Chen C ym. 2002). $\beta 4$ -alaysikkö vähentää todennäköisyyttä sille, että kanava menee nopeaan inaktivaatioon ja tällöin lyhentää aikaa, joka tarvitaan siitä toipumiseen. Se antaa neuroneille kyvyn tuottaa aktiopotentiaaleja tiheämpään tahtiin. Tämä ominaisuus johtuu siitä, että $\beta 4$ -alaysikkö kilpailee nopean inaktivaation aiheuttavan partikkelin kanssa kanavan tukkimisesta. Depolarisaation tapahtuessa $\beta 4$ -alaysikkö tukkii kanavan ja kun repolarisaatio tapahtuu, aukaisee se kanavan uudelleen, vähentäen tarvittavaa palautumisaikaa (Lewis

A & Raman I. 2014). Tämän lisäksi myös $\beta 4$ -alayksikkö lisää neuroneiden aktiivisuutta siirtämällä Na_v -kanavien aktivoitumista negatiivisimmille jännitteen arvoille (Chahine M & O'Leary M. 2011). Sähköfysiologisten toimintojen lisäksi β -alayksiköt ovat tärkeässä roolissa solujen adheesiossa ja migraatiossa. β -alayksiköiden vaikutukset kanavien kinetiikkaan ovat hienovaraisia, mutta tutkimukset ovat liittäneet muutokset β -alayksiköiden toiminnassa ja esiintymisessä useisiin sairauksiin kuten epilepsiaan, eteisvärinään, QT-syndroomaan ja neuropaattiseen kipuun (Brackenbury W & Isom L 2011). On mahdollista, että osa näistä β -alayksikköihin yhdistetyistä sairauksista liittyyvätkin ennemmin epänormaaliin solun adheesioon kuin muuttuneisiin sähköfysiologisiin ominaisuuksiin Na_v -kanavissa (Namadurai S ym. 2015).

4. Na_v -kanavat ja sairaudet

4.1 $\text{Na}_v 1.1$ -kanavat ja epilepsia

Epilepsiat ovat heterogeenien ryhmä sairauksia, jonka jäseniä yhdistävät toistuvasti tapahtuvat kohtaukset. Vaikka monet tekijät vaikuttavat epilepsiaan, viimeaikaiset työt ovat viittaavat siihen, että geneettiset tekijät ovat tärkeässä roolissa. *SCN1A* geeni on yhdistetty epilepsiaan useimmiten. Tämä geeni koodaa $\text{Na}_v 1.1$ -kanavan α -alayksikköä (Catterall W ym. 2010). ”Generalized epilepsy with febrile seizure plus” (GEFS+) on lievä, periytyvä epilepsia. Lapsena kohtaukset yleensä ilmenevät kuumeen yhteydessä ja aikuisena kohtaukset ilmenevät ilman mitään näkyvää syytä. Na_v -kanavien ja epilepsian välinen yhteys tuli esille ensi kertaa kokeessa, jossa tutkittiin australialaista perhettä, jossa esiintyi GEFS+:saa. Tutkimuksessa paikallistettiin mutaatio *SCN1B* geenissä, joka koodaa $\beta 1$ -alayksikköä. Mutaatio aiheutti sen, että $\beta 1$ ei pystynyt säätelemään kanavan kinetiikkaa (Wallace R ym. 1998). Nykyään on tunnistettu monia mutaatioita, jotka ovat yhteydessä GEFS+:saan. Mutaatiot, joita on onnistuttu liittämään GEFS+:ään, muuttavat monia kanavan ominaisuuksia niin neuroneissa kuin muissakin solutyypeissä. Tällöisiä muutoksia ovat muun muassa korkeampi jatkuva virta (”persistent current”), jänniteherkkyyden muutokset aktivaatiossa sekä inaktivaatiossa ja nopeutunut palautuminen nopeasta ja hitaasta inaktivaatiosta (Meisler M & Kearney A 2005). Pieni osa Na_v -kanavista ei mene inaktivaatioon aktiopotentiaalin jälkeen. Tällöin jäljelle jäävä virta (I_{Na}) on noin 1 % maksimaalisesta I_{Na} :sta ja tätä kutsutaan jatkuvaksi virraksi (Stafstrom C .2007). Korkeamman jatkuvan virran ajatellaan vähentävän depolarisaatiokynnystä, joka tarvitaan aktiopotentiaalin ampumiseen. Tämä taas johtaa liika-herkkyyteen. Nopea palautuminen inaktivaatiosta johtaa siihen, että isompi prosentti kanavista pystyy avautumaan depolarisaation tapahtuessa, mikä johtaa myös liika-herkkyyteen (Meisler M & Kearney A. 2005). Eläinkokeilla on pyritty selvittämään GEFS+-mutaatioiden funktionaalinen vaikutus neuroneihin. Kokeissa mutaatio R1648H (DIV jännitesensorin argiini¹⁶⁴⁸ mutatoitiin histidiiniksi) aiheutettiin hiiriin. Elektrofysiologiset analyysit

paljastivat, että mutaatio aiheutti hidastuneen palautumisen inaktivaatiosta bipolaarisissa inhibiittori neuroneissa. Toisaalta mutaatio aiheutti inaktiivisuuden jänniteriippuvuudessa siirtymistä hyperpolarisaation suuntaan (Tang B ym. 2009). Samankaltaisia tuloksia on saatu myös muista tutkimuksista R1648H mutaatiolla. R1648H mutaatio aiheutti hitaamman palautumisen inaktivaatiosta ja aktipotentiaalien vähentyneen ampumisen inhibiittorisissa kortikaalin interneuroneissa, kun taas kortikaalin aktivoivissa pyramidaalissa neuroneissa sillä ei ollut juurikaan vaikutusta. Tämä viittaisi siihen, että GABAergisten (Gamma-aminovoihappoa vapauttavien) neuronien kyky tuottaa tiheästi aktiopotentiaaleja heikkenee, mikä taas johtaa heikentyneeseen inhibitaatioon (Martin M ym. 2010). Tämän tyyllisiä tuloksia on myös saatu ”severe myoclinic epilepsy of infant” (SMEI) liittyvistä $Na_v1.1$ kokeista (Yu F ym. 2006). SMEI on erittäin raju epilepsia syndrooma. Se alkaa vuoden sisällä syntymästä ja kohtaukset ilmentyvät yleensä ilmenevät kohonneen kehonlämpötilan ohella. Kaksi vuotta syntymästä lapsille voi kehittyä muun muassa ataksia tai kognitiivisia häiriöitä (Catterall W ym.2010). Tuloksista näkyi että, $Na_v1.1$ kanavat johtavat noin 75 % GABAergic interneuroneiden kaikesta I_{Na} :sta. $Na_v1.1$ kanavien menetys alensi I_{Na} :ta GABAergic interneuroneissa hippokampuksessa. Tämä heikentynyt GABAergic neurotransmissio johtaa korkeampaan herkkyyteen näiden hermojen synapsien kohdehermoissa (Yu F ym.2006). Nämä tutkimustulokset antavat tukea ajatukselle, että $Na_v1.1$ -kanaviin liitettyjen epilepsioiden vakavuus olisi riippuvainen $Na_v1.1$ -kanavien funktionaalisten ominaisuuksien menetyksen rajuudesta. Osittainen $Na_v1.1$ -kanavien toimintojen heikentyminen aiheuttaisi GEFS+:n ja täydellinen funktion menetys johtaisi SMEI:n (Catterall W ym.2010).

4.2 $Na_v1.4$ - ja $Na_v1.6$ -kanavien yhteydet sairauksiin

Hypokaleeminen periodinen paralyysi (HypoPP) on dominoiva autosomaalinen luustolihaksien sairaus. Kohtauksen aikana luustolihaksien solukalvot pysyvät pitkään depolarisoituina ja veren kaliumin määrä vähentyy. Tällöin potilaalla esiintyy toistuvia kohtauksia, joka ilmenee raajojen velttoutena. Tämän biologinen mekanismi on vielä tosin hieman heikosti ymmärretty (Struyk A ym.2008). Lähes tulkoot kaikki mutaatiot, jotka on onnistuttu liittämään HypoPP:n ovat joko $Ca_v1.1$ - tai $Na_v1.4$ -kanavia koodaavissa geeneissä. $Na_v1.4$ -kanavien jännitesensoreissa ”gating-charge”:a kantavien arginiinien mutaatiot aiheuttavat ”gating pore current”:n mutatoituneeseen jännitesensorin domeeniin. Tällaisia mutaatioita on löydetty domeenien I-III jännitesensoreista (Groome J ym. 2014). Nämä mutaatiot aiheuttavat sen, että protonit tai kationit pääsevät kulkemaan S4:n läpi (eli syntyvät ”gating pore current”) (Groomer JR ym. 2017). Tästä syntynyt Na^+ -ionien virta on noin 1 %:n verran siitä mikä virtaa kanavan huokosen läpi (Sokolov S ym. 2010). Nämä ”gating pore currentit” melko pieniä ja on mahdollista, etteivät ne ole yksinään riittäviä luomaan 30–40mV depolarisaatiota, mikä

yleensä esiintyy HypoPP kohtausten aikana. Voi olla, että ”gating pore current”:n aiheuttavat sekundäärinen efektin, joka heikentäisi poikkijuovaisten lihaksien solukalvojen lepojännitteen stabiilisuutta. Toinen vaihtoehto voisi olla, että Na^+ -ionien sisään virtaus saattaisi lisätä Na^+/K^+ ATPase-pumpun toimintaa. Tämä taas johtaisi vähentyneeseen kaliumin määrään solun ulkopuolella. Mikä taas vähentäisi solujen kykyä sietää solun ulkopuolisen kaliumin konsentraation vähentymistä (Struyk A ym.2008). ”Gating pore current”:n lisäksi on paikallistettu mutaatio $\text{Na}_v1.4$ -kanavan domeenin III jännitesensorissa. Mutaatio täällä ajatellaan häiritsevän elektrostaattisia vuorovaikutuksia jännitesensorissa, jotka ovat tärkeitä palautumiselle nopeasta inaktivaatiosta (Groome J ym. 2014). Vaikka ”gating pore current”:n vaikutuksen määrästä HypoPP:n syntymiseen on epäselvyyttä, on kuitenkin selvää, että ne ovat osittain vastuussa siitä (Sokolov S ym. 2010) (Struyk A ym.2008). 1-(2,4-xylyl)-guanidiinihydrokloridi pystyy tukkimaan nämä ”gating pore current”:tit ja luo tukea ajatukselle, että guanidi-pohjaiset blokkerit voisivat osoittautua hyödylliseksi HypoPP:n hoidossa (Sokolov S ym. 2010).

$\text{Na}_v1.6$ -kanavilla on tärkeä rooli hermojen herkkyyden säätelyssä. Niiden roolit ”persistent current”:ssa sekä ”resurgent current”:ssa, jänniteriippuvaisesta aktivoitumisesta ja niiden lokalisaatio aktiopotentiaalin aloituskohtiin ovat tärkeitä ominaisuuksia ylläpitämään hermoston normaalia herkkyyttä (O’Brien J & Meisler M. 2013). ”Resurgent current” syntyy kun osa kanavista aukeaa repolarisaation takia, eli ne aukeavat negatiivisen jännitteen muutoksen takia. Tämä vähentää aikaa, joka vaaditaan aktiopotentiaalista palautumiseen ja näin ollen mahdollistaa nopean ja toistuvan aktiopotentiaalien ampumisen (Lewis A & Raman I.2014). Näiden ”resurgent current”:ien ajatellaan vaikuttavan Purkinje solujen spontaaniin ampumiseen. β_4 -alayksikön ajatellaan myös liittyvän ”resurgent currentin” syntymiseen pikkuaivojen Purkinje soluissa. ”Persistent current”:ien ajatellaan puolestaan olevan tärkeä osa pikkuaivojen Purkinje solujen kykyä toistuvaan ampumiseen. $\text{Na}_v1.6$ -kanavat myös menevät pienemmällä todennäköisyydellä inaktivaatioon korkeammilla ärsykkeiden frekvensseillä. Mutaatio *SCN8A*, joka koodaa $\text{Na}_v1.6$ -kanavia on liitetty lapsilla esiintyvään epilepsiaan. Potilaalla ilmeni autismin tunnusmerkkejä, kehitysvammaisuutta ja ataksiaa. Mutanttikanavalla ”persistent current”:tit kasvoivat ja inaktivaatio oli puutteellista. Tutkimuksissa on myös onnistuttu yhdistämään missense mutaatiot $\text{Na}_v1.6$ -kanavan domeenin IV jännitesensorissa kehitysvammaisuuteen (O’Brien J & Meisler M. 2013). Viittaisi siihen, että kanavien noussut aktiivisuus liittyisi kohtauksiin, kun taas *SCN8A* osittainen menetys liittyisi kehitysvammaisuuteen (O’Brien J & Meisler M. 2013).

4.3 Na_v1.5 ja sydänsairaudet

Na_v1.5-kanavat ovat pääasiallinen Na_v-kanavatyyppejä sydämessä. Ne ovat vastuussa suurimmasta osasta aktiopotentiaalien aloituksesta ja levittämisestä (Mohler P ym. 2004). Monet mutaatiot *SCN5A* geenissä, joka koodaa Na_v1.5-kanavia, on liitetty erilaisiin sydänsairauksiin. Yleensä mutaatiot aiheuttavat erilaisia sydämen rytmihäiriöitä kuten ”Long QT-syndrome”, ”Brugada syndrome” ja ”sick sinus syndrome” (Tfelt-Hansen J ym. 2009). ”Long QT-syndrome”:ssa yleistä on pidempi väli Q- ja T-aaltojen välillä mitattaessa sydämensähkökäyrää. Tämä voi johtaa sydänhalvaukseen. Suurin osa mutaatiosta, jotka on liitetty ”Long QT-syndrome”:n aiheuttavat viivästyneen nopean inaktivaation. Tällöin I_{Na} vähenee hitaammin johtaen pitempään intervalliin Q- ja T-aaltojen välillä (Ruan Y. 2007). ”Brugada syndrome” on perinnöllinen sydänsairaus, jota luonnehtii sydänsähkökäyrän ST-segmentin kohonnut taso. Vähentyneet I_{Na}, I_{Ca} ja lisääntynyt I_{to} (syntyy ohimenevästä ulospäin suuntautuvasta K⁺-ionien synnyttämästä virrasta) on yhdistetty tähän sairauteen (Tfelt-Hansen J ym. 2009). Muun muassa mutaatio E1053K on liitetty tähän sairauteen. Se lopettaa ankyrin-G:n kiinnittymisen Na_v1.5 kanavaan ja estää kanavien kerääntymisen solukalvolle. Kanavien määrän väheneminen voi johtaa ”Brugada syndrome”:aan (Mohler P ym. 2004). Noin 15 % tapauksista aiheutuu *SCN5A* geenissä olevista mutaatioista (Tfelt-Hansen J ym. 2009). On myös ehdotettu, että mutaatiot jotka aiheuttavat ”pore gating current”:n syntymistä Na_v1.5-kanavissa voisivat olla osaltaan vastuussa erilaisten rytmihäiriöiden synnyssä (Moreau A ym. 2015). Sydämen rytmihäiriöihin liitettyjen Na_v1.5-kanavan mutaatioiden määrä on jatkuvassa kasvussa. Tulevaisuudessa kasvava ymmärrys Na_v-kanavista toivottavasti johtaisi Na_v-kanava spesifisiin lääkkeisiin, joilla pystyttäisiin hoitamaan sydämen rytmihäiriöitä entistä tehokkaammin (Tfelt-Hansen J ym. 2009).

4.4 Na_v-kanavat ja kipu

Kivun tarkoitus on varoittaa meitä haitallisesta/vaarallisesta ärsykkeestä tai vauriosta ja aktivoida samalla suojaavia responsseja. Kivun aistimus syntyy, kun nosiseptoreiksi kutsutut tuntohermot aktivoituvat kehoa mahdollisesti vaurioittavista stimuluksista. Elektrofysiologisissa tutkimuksissa on löydetty tuntohermoja, jotka voivat aktivoitua liian korkeasta lämpötilasta, kovasta paineesta tai ärsyttävistä kemikaaleista. Nämä eivät kuitenkaan aktivoituneet harmittomista stimuluksista, joten lyhytkestoisen kivun voidaan tarkastella aistimuksen laatuna (Julius D & Basbaum A 2001). Kivun hyödyllisyys on lyhytikäistä ja pitkään jatkuva kipu (krooninen kipu) on ratkaisua vailla oleva lääketieteellinen ongelma (Hameed S. 2019).

Jänniteherkät natriumkanavat ovat tärkeässä roolissa kivun aistimisessa, sillä ne ovat vastuussa hermojen herkkyydestä (Lulz A ym. 2015). Kanavatyypeistä Na_v1.7, Na_v1.8 ja Na_v1.9 esiintyy paljon

”nociceptor”:ssa, joita löytyy ääreishermostosta ja dorsaalijuuren gangliossa (Faber C. 2012). $Na_v1.7$ -kanavalla on hitaampi ”closed-state inactivation” kehitys kuin muilla Na_v -kanavilla. Tämä tarkoittaa, että kanava on mennyt inaktivaatioon ennen kuin kanava on saavuttanut virtaa johtavan tilan (Armstrong, C. M. 2006). Tämä hidas ”slow-state inactivation” mahdollistaa sen, että $Na_v1.7$ -kanavat pystyvät vastamaan pieniin ja hitaisiin depolarisaatioihin. Lisäksi on huomattu, että $Na_v1.7$ sijoittuvat ”nociceptor”:ien hermojen terminaaleihin, jossa reseptoripotentiaalit tapahtuvat. Täällä ne voivat mahdollisesti vahvistaa näitä potentiaaleja. $Na_v1.7$ ajatellaan asettavan kynnyksen signaalien voimakkuudella ja amplitudille (Hameed S. 2019). $Na_v1.8$ -kanavalla puolestaan on nopeampi palautuminen inaktivaatiosta ja depolarisoitunut aktivaation ja inaktivaation jänniteherkkyys verrattuna muihin Na_v -kanaviin. Nämä ominaisuudet korostavat $Na_v1.8$ -kanavien tärkeyttä toistuvalla ampumisella ja hermojen herkkyydelle (Hameed S. 2019). $Na_v1.8$ -kanavat ovat vastuussa suuresta osasta sisäänpäin suuntautuvasta virrasta aktiopotentiaalin nousuvaiheessa. $Na_v1.9$ ylläpitävät toistuvaa ampumista ja tasaisia jännitteen arvoja. Tämä johtuu siitä, että niiden aktivaatio tapahtuu suhteellisen negatiivisilla jännitteen arvoilla. Lisäksi $Na_v1.9$ -kanavien inaktivaatio on hidas ja epätäydellinen, mikä johtaa jatkuvaan Na^+ -ionien virtaan jännitteen arvoilla, jotka ovat alle aktivaatiokynnyksen (Lulz A. 2015). Tutkimukset ovat onnistuneet yhdistämään $Na_v1.7$, $Na_v1.8$ ja $Na_v1.9$ -kanavat useisiin kipusairauksiin (Hameed S. 2019; Lulz A. 2015; Huang J ym. 2014).

Neuropaattinen kipu tarkoittaa kipua, joka johtuu vammasta tai sairaudesta mikä vaikuttaa tuntoaistijärjestelmään. Vammat hermostossa aiheuttavat plastisia muutoksia. Tällöin hermojen solukalvot muovaantuvat uudelleen ja niistä tulee herkempiä johtuen muuttuneesta kipuaistimuksen kynnyksestä. Kun taas tulehduskipu johtuu kudonsvauriosta, jota seuraa tulehtuminen. Tästä seuraa, että tulehdusta edistävien aineiden sekä tuottaminen että vapauttaminen kasvaa. Aineet kuten sytokiniitit herkistävät ”nociceptor”:it tulehdusalueelta. Plastiset muutokset herkkyydessä johtavat tämän tulehduskivun luomiseen ja ylläpitämiseen. Uskotaan, että muutokset, jotka aiheuttavat tämän epänormaalin hermojen aktiivisuuden johtuvat $Na_v1.7$ -ja $Na_v1.8$ -kanatyypin tiheyden, levinneisyyden ja ominaisuuksien muutoksista (Hameed S. 2019). Kivulias ääreishermostoon vaikuttava sairaus ”small-fibre neuropathy” (SFN) on onnistuttu liittämään $Na_v1.7$ ja $Na_v1.8$ -kanaviin (Faber C. 2012) (Hoeijmakers J. 2012). Jopa 30 % tutkimuksen potilaista omasi $Na_v1.7$ -kanavan variantin (Hoeijmakers J. 2012). Toisessa tutkimuksessa $Na_v1.8$ -kanavan variantit onnistuttiin yhdistämään SFN:n. Mutaatiot näissä kanavissa aiheuttivat tehostetun aktivaatioon ja suuremman herkkyyden pienissä DRG:n hermoissa. Tarkka mekanismi, joka aiheuttaisi nämä muutokset kanavissa on kuitenkin vielä epäselvä (Faber C. 2012). Myös $Na_v1.9$ -kanavat on liitetty kivuliaisiin ääreishermostoon vaikuttaviin sairauksiin (Huang J ym. 2014). Tämän lisäksi $Na_v1.9$ -kanavien

mutaatiot on yhdistetty harvinaiseen ”Familial episodic pain” (Zhang X ym.2013). Molemmissa tapauksissa ilmeni, että kanavien tuottamien virtojen tiheys kasvoi, ilman että kanavan ”gating” ominaisuudet muuttuivat. Tämän lisäksi DRG:n hermojen herkkyys kasvoi, ilman että hermojen lepojännitteessä tapahtui muutoksia (Huang J ym.2014). Trigeminaalinen neuralgia on kipusyndrooma, jossa ilmenee erittäin kovia kasvokipuja. Tutkimuksessa osoitettu, että $\text{Na}_v1.9$ -kanavat liittyvät kipuaistivien trigeminaali hermojen pitkäkestoiseen ampumiseen. Vaikka $\text{Na}_v1.9$ -kanavilla on selvästi tärkeä rooli kipuaistimuksen kynnyksien säätelyssä, on mekanismi, joka vaikuttaa erilaisiin kipujen fenotyyppeihin vielä tuntematon (Lulz A ym.2015).

5. Loppusanat

Ihmisen hermosto on ällistytävä ja monimutkainen biologinen ”kone”, joka mahdollistaa sen, että pystymme kokemaan maailman aisteillamme ja liikkumaan siinä. Häiriöt tässä biologisen ”koneen” toiminnassa ilmenevät useasti erilaisina neurologisina sairauksina. Na_v -kanavat($\text{Na}_v1.1$ - $\text{Na}_v1.9$) ovat yksi tärkeä pala tätä suurta palapeliä. Ymmärtämällä paremmin jänniteherkkiä natriumkanavia pääsemme lähemmäksi ihmisen hermoston toiminnan ymmärtämistä. Na_v -kanavien kyky tuottaa nopea depolarisaatio on olennainen osa aktiopotentiaalın syntyä. Tällä hetkellä meillä ei ole vielä täydellistä 3D-kuvaa eukaryoottien Na_v -kanavista. Siitä huolimatta tutkijat ovat pystyneet tunnistamaan tärkeitä aminohappoja muun muassa ioniselektiivisyyden, jänniteherkkyyden ja inaktivaation suhteen. Lisäksi useita mutaatioita Na_v -kanavissa on yhdistetty lukuisiin erilaisiin neurologisiin sairauksiin. Tulevaisuuden tutkimukset luultavasti valottavat vielä enemmän Na_v -kanavien roolia näissä sairauksissa. Voi olla myös mahdollista, että tutkimuksissa pystytään kehittämään mahdollisia kanavaspesifisiä lääkkeitä, jotka tehostaisivat näiden sairauksien hoitoja. Erityisen mielenkiintoista tulee olemaan, pystyvätkö tulevaisuuden tutkimukset yhdistämään Na_v -kanavien toimintojen häiriöitä psykologisiin sairauksiin.

6. Lähdeluettelo

- Ahern, C. A., Payandeh, J., Bosmans, F., & Chanda, B. (2016). The hitchhiker's guide to the voltage-gated sodium channel galaxy. *The Journal of general physiology*, 147(1), 1–24.
- Armstrong, C. M. (2006). Na channel inactivation from open and closed states. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(47), 17991-17996.
- Armstrong, C. M., & Bezanilla, F. (1974). Charge movement associated with the opening and closing of the activation gates of the Na channels. *The Journal of general physiology*, 63(5), 533-552.
- Armstrong, C. M., & Hille, B. (1998). Voltage-gated ion channels and electrical excitability. *Neuron*, 20(3), 371-380.
- Bezanilla, F., & Armstrong, C. M. (1977). Inactivation of the sodium channel. I. Sodium current experiments. *The Journal of general physiology*, 70(5), 549.
- Boyle, P. J., & Conway, E. J. (1941). Potassium accumulation in muscle and associated changes¹. *The Journal of Physiology*, 100(1), 1-63. doi:10.1113/jphysiol.1941.sp003922
- Brackenbury, W. J., & Isom, L. L. (2011). Na⁺ channel β subunits: overachievers of the ion channel family. *Frontiers in pharmacology*, 2, 53.
- Catterall, W. A. (1986). Voltage-dependent gating of sodium channels: correlating structure and function. *Trends in Neurosciences*, 9, 7-10.
- Catterall, W. A. (2000). From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 26(1), 13-25.
- Catterall, W. A., Kalume, F., & Oakley, J. C. (2010a). NaV1.1 channels and epilepsy. *The Journal of Physiology*, 588(11), 1849-1859. doi:10.1113/jphysiol.2010.187484
- Chahine, M., & O'Leary, M. E. (2011). Regulatory role of voltage-gated Na⁺ channel β subunits in sensory neurons. *Frontiers in pharmacology*, 2, 70.
- Chanda, B., & Bezanilla, F. (2002). Tracking voltage-dependent conformational changes in skeletal muscle sodium channel during activation. *The Journal of general physiology*, 120(5), 629-645.
- Chen, C., Bharucha, V., Chen, Y., Westenbroek, R. E., Brown, A., Malhotra, J. D., & Kazarinova-Noyes, K. (2002). Reduced sodium channel density, altered voltage dependence of inactivation, and increased

susceptibility to seizures in mice lacking sodium channel $\beta 2$ -subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(26), 17072-17077.

Danielli, J. F., & Davson, H. (1935a). A contribution to the theory of permeability of thin films. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 5(4), 495-508.

Das, S., Gilchrist, J., Bosmans, F., & Van Petegem, F. (2016). Binary architecture of the Nav1. 2- $\beta 2$ signaling complex. *Elife*, 5, e10960.

Eaholtz, G., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1994). Restoration of inactivation and block of open sodium channels by an inactivation gate peptide. *Neuron*, 12(5), 1041-1048.

Erecińska, M., & Silver, I. A. (1994). Ions and energy in mammalian Brain. *Progress in neurobiology*, 43(1), 37-71

Faber, C. G., Lauria, G., Merkies, I. S., Cheng, X., Han, C., Ahn, H., Pierro, T. (2012). Gain-of-function Nav1. 8 mutations in painful neuropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(47), 19444-19449.

Fozzard, H. A., & Lipkind, G. M. (2010). The tetrodotoxin binding site is within the outer vestibule of the sodium channel. *Marine drugs*, 8(2), 219-234.

Frank, H. Y., & Catterall, W. A. (2003). Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome biology*, 4(3), 207.

Frank, H. Y., Mantegazza, M., Westenbroek, R. E., Robbins, C. A., Kalume, F., Burton, K. A., Catterall, W. A. (2006). Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Nature Neuroscience*, 9(9), 1142.

Goldin, A. L. (2003). Mechanisms of sodium channel inactivation. *Current opinion in neurobiology*, 13(3), 284-290.

Goldschen-Ohm, M. P., Capes, D. L., Oelstrom, K. M., & Chanda, B. (2013a). Multiple pore conformations driven by asynchronous movements of voltage sensors in a eukaryotic sodium channel. *Nature Communications*, 4, 1350.

- Goldschen-Ohm, M. P., Capes, D. L., Oelstrom, K. M., & Chanda, B. (2013b). Multiple pore conformations driven by asynchronous movements of voltage sensors in a eukaryotic sodium channel. *Nature Communications*, 4, 1350.
- Groome, J. R., Lehmann-Horn, F., Fan, C., Wolf, M., Winston, V., Merlini, L., & Jurkat-Rott, K. (2014). NaV1.4 mutations cause hypokalaemic periodic paralysis by disrupting IIIS4 movement during recovery. *Brain*, 137(4), 998-1008.
- Groome, J., Lehmann-Horn, F., & Holzherr, B. (2011). Open-and closed-state fast inactivation in sodium channels: Differential effects of a site-3 anemone toxin. *Channels*, 5(1), 65-78.
- Groome, J. R., Moreau, A., & Delemotte, L. (2017). Gating pore currents in sodium channels. In *Voltage-gated Sodium Channels: Structure, Function and Channelopathies* (pp. 371-399). Springer, Cham.
- GuY, H. R., & Seetharamulu, P. (1986). Molecular model of the action potential sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(2), 508-512.
- Hameed, S. (2019). Nav1. 7 and Nav1. 8: Role in the pathophysiology of pain. *Molecular Pain*, 15, 1744806919858801.
- Heinemann, S. H., Terlau, H., Stühmer, W., Imoto, K., & Numa, S. (1992). Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature*, 356(6368), 441.
- Herrmann T, Sharma S. Physiology, Membrane. [Updated 2019 Mar 2]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538211/>
- Hirschberg, B., Rovner, A., Lieberman, M., & Patlak, J. (1995). Transfer of twelve charges is needed to open skeletal muscle Na⁺ channels. *The Journal of general physiology*, 106(6), 1053-1068.
- Hodgkin, A. L., & Huxley, A. F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of physiology*, 117(4), 500-544.
- Hodgkin, A. L., & Katz, B. (1949). The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *The Journal of physiology*, 108(1), 37-77

- Hoeijmakers, J. G., Faber, C. G., Lauria, G., Merkies, I. S., & Waxman, S. G. (2012). Small-fibre neuropathies—advances in diagnosis, pathophysiology and management. *Nature Reviews Neurology*, 8(7), 369.
- Huang, J., Han, C., Estacion, M., Vasylyev, D., Hoeijmakers, J. G., Gerrits, M. M., . . . Dib-Hajj, S. D. (2014). Gain-of-function mutations in sodium channel Nav1. 9 in painful neuropathy. *Brain*, 137(6), 1627-1642.
- Julius, D., & Basbaum, A. I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413(6852), 203.
- Keener, J. & Sneyd, J. (1998). *Mathematical physiology*. New York: Springer. Pages 49-50.
- Kristan Jr, W. B. (2016). Early evolution of neurons. *Current Biology*, 26(20), R949-R954.
- Lewis, A. H., & Raman, I. M. (2014). Resurgent current of voltage-gated na channels. *The Journal of Physiology*, 592(22), 4825-4838.
- Lulz, A. P., Kopach, O., Santana-Varela, S., & Wood, J. N. (2015a). The role of Nav1. 9 channel in the development of neuropathic orofacial pain associated with trigeminal neuralgia. *Molecular Pain*, 11, s1299-4.
- Martin, M. S., Dutt, K., Papale, L. A., Dubé, C. M., Dutton, S. B., de Haan, G., . . Baram, T. Z. (2010). Altered function of the SCN1A voltage-gated sodium channel leads to γ -aminobutyric acid-ergic (GABAergic) interneuron abnormalities. *Journal of Biological Chemistry*, 285(13), 9823-9834.
- McPhee, J. C., Ragsdale, D. S., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1998). A critical role for the S4-S5 intracellular loop in domain IV of the sodium channel α -subunit in fast inactivation. *Journal of Biological Chemistry*, 273(2), 1121-1129.
- Meisler, M. H., & Kearney, J. A. (2005). Sodium channel mutations in epilepsy and other neurological disorders. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(8), 2010-2017.
- Mohler, P. J., Rivolta, I., Napolitano, C., LeMaillet, G., Lambert, S., Priori, S. G., & Bennett, V. (2004). Nav1. 5 E1053K mutation causing Brugada syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Nav1. 5 on the surface of cardiomyocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(50), 17533-17538
- Moran, Y., Barzilai, M. G., Liebeskind, B. J., & Zakon, H. H. (2015). Evolution of voltage-gated ion channels at the emergence of Metazoa. *Journal of Experimental Biology*, 218(4), 515-525.

- Moreau, A., Gosselin-Badaroudine, P., Delemotte, L., Klein, M. L., & Chahine, M. (2015). Gating pore currents are defects in common with two Nav1. 5 mutations in patients with mixed arrhythmias and dilated cardiomyopathy. *The Journal of general physiology*, 145(2), 93-106.
- Namadurai, S., Yereddi, N. R., Cusdin, F. S., Huang, C. L. H., Chirgadze, D. Y., & Jackson, A. P. (2015). A new look at sodium channel β subunits. *Open biology*, 5(1), 140192.
- Noda, M., Suzuki, H., Numa, S., & Stühmer, W. (1989). A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on the sodium channel II. *FEBS letters*, 259(1), 213-216.
- Novak, A. E., Jost, M. C., Lu, Y., Taylor, A. D., Zakon, H. H., & Ribera, A. B. (2006). Gene duplications and evolution of vertebrate voltage-gated sodium channels. *Journal of molecular evolution*, 63(2), 208-221.
- O'Brien, J. E., & Meisler, M. H. (2013). Sodium channel SCN8A (Nav1. 6): Properties and de novo mutations in epileptic encephalopathy and intellectual disability. *Frontiers in Genetics*, 4, 213.
- Pivovarov, A. S., Calahorra, F., & Walker, R. J. (2019). Na⁺/K⁺-pump and neurotransmitter membrane receptors. *Invertebrate Neuroscience*, 19(1), 1.
- Purves, D. (2012). *Neuroscience* (5th ed.). Sunderland, Mass: Sinauer Associates. Pages 25-38.
- Ruan, Y., Liu, N., Bloise, R., Napolitano, C., & Priori, S. G. (2007). Gating properties of SCN5A mutations and the response to mexiletine in long-QT syndrome type 3 patients. *Circulation*, 116(10), 1137-1144.
- Singer, S. J., & Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175(4023), 720-731.
- Sokolov, S., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (2010). Ion permeation and block of the gating pore in the voltage sensor of Nav1. 4 channels with hypokalemic periodic paralysis mutations. *The Journal of General Physiology*, 136(2), 225-236.
- Stafstrom, C. E. (2007). Persistent sodium current and its role in epilepsy. *Epilepsy Currents*, 7(1), 15-22.
- Struyk, A. F., Markin, V. S., Francis, D., & Cannon, S. C. (2008). Gating pore currents in DIIS4 mutations of Nav1. 4 associated with periodic paralysis: Saturation of ion flux and implications for disease pathogenesis. *The Journal of General Physiology*, 132(4), 447-464.

- Stühmer, W., Conti, F., Suzuki, H., Wang, X., Noda, M., Yahagi, N., & Numa, S. (1989). Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature*, 339(6226), 597.
- Tang, B., Dutt, K., Papale, L., Rusconi, R., Shankar, A., Hunter, J., . . . Mantegazza, M. (2009). A BAC transgenic mouse model reveals neuron subtype-specific effects of generalized epilepsy with febrile seizures plus (GEFS) mutation. *Neurobiology of Disease*, 35(1), 91-102.
- TFELT-HANSEN, J. A. C. O. B., Winkel, B. G., Grunnet, M., & Jespersen, T. (2010). Inherited cardiac diseases caused by mutations in the Nav1. 5 sodium channel. *Journal of cardiovascular electrophysiology*, 21(1), 107-115.
- Vilin, Y. Y., & Ruben, P. C. (2001). Slow inactivation in voltage-gated sodium channels. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 35(2), 171-190.
- Wallace, R. H., Wang, D. W., Singh, R., Scheffer, I. E., George Jr, A. L., Phillips, H. A., ... & Berkovic, S. F. (1998). Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na⁺-channel β 1 subunit gene SCN1B. *Nature genetics*, 19(4), 366.
- Widmark, J., Sundström, G., Ocampo Daza, D., & Larhammar, D. (2010). Differential evolution of voltage-gated sodium channels in tetrapods and teleost fishes. *Molecular biology and evolution*, 28(1), 859-871
- Woodhull, A. M. (1973). Ionic blockage of sodium channels in nerve. *The Journal of general physiology*, 61(6), 687-708.
- Yang, N., & Horn, R. (1995). Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channels. *Neuron*, 15(1), 213-218.
- Yang, N., George Jr, A. L., & Horn, R. (1996). Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 16(1), 113-122.
- Yu FH, Mantegazza M, Westenbroek RE, Robbins CA, Kalume F, Burton KA, Spain WJ, McKnight GS, Scheuer T & Catterall WA (2006). Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Nat Neurosci* 9, 1142–1149.

- Zakon, H. H. (2012). Adaptive evolution of voltage-gated sodium channels: the first 800 million years. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(Supplement 1), 10619-10625
- Zakon, H. H., Jost, M. C., & Lu, Y. (2010). Expansion of voltage-dependent Na⁺ channel gene family in early tetrapods coincided with the emergence of terrestriality and increased brain complexity. *Molecular biology and evolution*, 28(4), 1415-1424.
- Zhang, X. Y., Wen, J., Yang, W., Wang, C., Gao, L., Zheng, L. H., Li, X. (2013). Gain-of-function mutations in SCN11A cause familial episodic pain. *The American Journal of Human Genetics*, 93(5), 957-966.
- Zhu, W., Voelker, T. L., Varga, Z., Schubert, A. R., Nerbonne, J. M., & Silva, J. R. (2017). Mechanisms of noncovalent β subunit regulation of NaV channel gating. *The Journal of general physiology*, 149(8), 813–831.